

**MATERIAL FOR MEAT GRAIN**

Patent Number: JP2100651  
Publication date: 1990-04-12  
Inventor(s): TAKAGAKI YASUO; others: 01  
Applicant(s):: AJINOMOTO CO INC; others: 01  
Requested Patent: ☐ JP2100651  
Application Number: JP19880251623 19881005  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A23L1/317 ; C12N9/10  
EC Classification:  
Equivalents: JP2556109B2

---

**Abstract**

---

**PURPOSE:**To obtain the subject inexpensive material, consisting of a pasty meat material and a transglutaminase, capable of imparting good meat grain texture and useful for cattle meat paste products, such as hamburger steak, shao-mai, 'GYOZA' (fried dumpling stuffed with minced pork) or fried meat cake  
**CONSTITUTION:**The objective material consisting of a pasty meat material and a transglutaminase. Furthermore, the above-mentioned transglutaminase is preferably contained in an amount of 0.1-1000U based on 1g protein in the afore-mentioned pasty meat material.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-100651

⑤Int.Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 平成2年(1990)4月12日  
 A 23 L 1/317 Z 2114-4B  
 C 12 N 9/10 7823-4B  
 // A 23 J 3/00 5 0 5 6712-4B  
 審査請求 未請求 請求項の数 2 (全8頁)

⑭発明の名称 肉粒用素材

⑮特 願 昭63-251623

⑯出 願 昭63(1988)10月5日

⑰発 明 者 高 垣 康 雄 群馬県邑楽郡大泉町大字吉田1222番地 味の素冷凍食品株式会社冷凍食品開発研究所内  
 ⑰発 明 者 成 川 和 枝 群馬県邑楽郡大泉町大字吉田1222番地 味の素冷凍食品株式会社冷凍食品開発研究所内  
 ⑰出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号  
 ⑰出 願 人 味の素冷凍食品株式会社 群馬県邑楽郡大泉町大字吉田1222番地  
 ⑰代 理 人 弁理士 川口 義雄 外3名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

肉粒用素材

## 2. 特許請求の範囲

(1) パースト状の食肉素材及びトランスグルタミナーゼからなる冷凍肉粒用素材。

(2) 前記トランスグルタミナーゼが、前記パースト状食肉素材中の蛋白1gに対して0.1乃至1,000Unit含有されることを特徴とする請求項1の冷凍肉粒用素材。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔利用分野〕

本発明はパースト状の食肉素材にトランスグルタミナーゼ(T.G.a.s.e)を作用させることにより得られる新規肉粒用素材に関する。

## 〔従来技術〕

シューマイ、ハンバーグなどの畜肉練製品を製

造する場合、従来、チキンペーストなどの安価な食肉素材が、食肉の代替又は増量などの目的でえられていた。

## 〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、従来行われていたごとく、チキンペーストなどの安価な食肉素材をシューマイ、ハンバーグなどの畜肉練製品に単に混合しただけでは最終製品に肉粒感を賦与することは難しく、このため、安価な食肉素材を多量に使用するの困難であった。

## 〔課題を解決するための手段〕

本発明は、このような欠点を解決し、従来使用されているチキンペーストなどの食肉素材を改質して、最終製品に良好な肉粒感を賦与することができる新規肉粒用素材を開発すべくなされたものである。

本発明者等は、アシル転移酵素の一つである

T G a s e の、食品蛋白中に多く含有されるグルタミン残基とリジン残基間に架橋を形成する作用に着目し、研究した結果、ペースト状食肉素材を T G a s e を用いて改質すると、良好な肉粒感を賦与することが出来る肉粒用素材を安価に製造することができ、これにより安価な食肉素材の多量使用が可能になることを見出し、本発明を為すに至った。

すなわち、本発明はペースト状の食肉素材及び T G a s e からなる冷凍肉粒用素材に関する。

本発明において用いられるペースト状食肉素材としては、骨肉分離機で分離した厨肉、エキス抽出後の残渣肉などを摩砕してペースト状にしたものが使用できる。なお、ペースト状食肉素材は、骨、腱などの付着物を含んでいてもよい。食肉の種類としては、通常食用に供されるものであればよく、牛肉、豚肉、鶏肉、羊肉、馬肉などの畜肉

以下に本発明の冷凍肉粒用素材の製法について説明する。

前記したペースト状の食肉素材に、該食肉素材中の蛋白 1g に対して 0.1乃至 1,000U、好ましくは、1乃至 500U の T G a s e を加える。T G a s e は粉末のまま加えてもよいが、水溶液にしてから加えるのが、均一に混合しやすいので好ましい。この場合、T G a s e 1g を 5~100 ㎖の水に対して溶解するのが好ましい。モルモット由来の T G a s e (M T G a s e) はカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 依存性であるが、通常ペースト状食肉素材はカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を含有しているのでカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 源を特に添加する必要はない。しかしながら、必要に応じて  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  などを M T G a s e 1U に対して 1~100mM 程度加えてもよい。

を挙げることができる。

本発明において用いられる T G a s e の由来は特に限定されるものではなく、食品蛋白中に含まれるグルタミン残基とリジン残基間に架橋を形成し、ペースト状食肉素材に肉粒感を賦与することができるものであれば、いずれも使用することができる。具体的には、例えば、本出願人の一部による特開昭 58-149645に記載されたモルモット肝由来の T G a s e (M T G a s e) を挙げることができる。更に、本出願人の一部による特開昭 62-165067には、微生物、例えば、ストレプトバチルス属の菌により産生される微生物由来の新規な T G a s e (B T G a s e) が開示されている(新規 B T G a s e の製造方法、酵素特性等については後述する)。本発明においては、このような B T G a s e をも使用できることは勿論である。

T G a s e とペースト状の食肉素材の混合は、通常的手段を用いて行えばよく、例えば、混練機などの攪拌装置を用いて、あるいは、直接手で攪拌混合してもよい。

この場合、肉粒を大きくする目的で、ペースト状食肉素材に対して、0.1~1%の食塩を混合(塩ずり)してもよい。更に、必要に応じて、調味料、香辛料、糖質、多量類などの通常食用に供される添加物をペースト状食肉素材に加えてもよい。これらの添加物は T G a s e と共に加えるのが簡便であるが、必要により別途添加してもよい。

T G a s e を添加してよく混合したペースト状食肉素材を、各種用途に応じた適当な容器に充填し、30~60℃で10分~2時間保持し、トランスグルタミナーゼ反応を行わせる。

T G a s e は特に失活処理などは不要であるが、酵素反応を停止させて品質を一定に保たせる点で

失活させてもよい。失活は、例えば、80℃で30分あるいは85℃で35分程度加熱すればよい。

酵素反応終了後、粉られた肉粒用素材を通常の手段を用いて冷凍することにより、本発明の冷凍肉粒用素材を得ることができる。

上述のようにして粉られた本発明の冷凍肉粒用素材は、適当な段階にまで解凍し、ミンチ機などによりミンチし、各種畜肉練製品、例えば、ハンバーグ、シューマイなどの原料に加えて使用される。解凍は、ミンチしやすく、且つ、畜肉練製品に良好な肉粒感を賦与することができる程度にまで解凍すればよく、これは使用に際して容易に決めることができる。

本発明の冷凍肉粒用素材は、各種畜肉練製品中の肉の代替として又は増量として用いることができる。すなわち、肉と併用してもあるいは肉の代替物として用いてもよい。

トベルチシリウム属の菌により産生されるものである。

#### ② B T G a s e の製造

B T G a s e を産生する微生物は、例えば、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム (*Streptovercillium griseocarneum*) [F O 12776、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (*Streptovercillium cinamomeum* sub sp. *cinamomeum*) [F O 12852、ストレプトベルチシリウム・モバラエンス (*Streptovercillium mobaraense*) [F O 13819等があげられる。

これら微生物を培養し、トランスグルタミナーゼを取得するための培養法及び精製法等は次の通りである。

培養形態としては、液体培養、固体培養いずれも可能であるが、工業的には深部通気攪拌培養を

以下に本発明で用いる新規 B T G a s e について述べる。

(本発明で用いる新規トランスグルタミナーゼ B T G a s e )

#### (1) トランスグルタミナーゼとその由来

トランスグルタミナーゼ(以下、T G a s e と略称することがある。)は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基の $\alpha$ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。この T G a s e は、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基が作用すると、分子内及び分子間に $\epsilon$ -( $\alpha$ -G l u)-L y s 架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

本発明で使用する新規トランスグルタミナーゼ (B T G a s e) は、微生物、例えば、ストレブ

行うのが有利である。又、使用する培養源としては、一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩及びその他の微量栄養源の他、ストレプトベルチシリウム属に属する微生物の利用出来る栄養源であれば全て使用出来る。培地の炭素源としては、ブドウ糖、ショ糖、ラスターゲン、グリセリン、デキストリン、澱粉等の他、脂肪酸、油脂、有機酸などが単独で又は組合せて用いられる。窒素源としては、無機窒素源、有機窒素源のいずれも使用可能であり、無機窒素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、塩化アンモニウム等が挙げられる。又、有機窒素源としては大豆、米、トウモロコシ、小麦などの粉、糠、脱脂粕をはじめコーンステイアプリーカー、ペプトン、肉エキス、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス等が挙げられる。無機塩及び微量栄養素としては、リン酸、マグネシウム、カリ

ウム、鉄、カルシウム、亜鉛等の塩類の他ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等の菌の生育やBTGaseの産生を促進するものであれば必要に応じて使用出来る。

培養は好氣的条件で、培養温度は菌が発育しBTGaseが産生する範囲であれば良く、好しくは25~35℃である。培養時間は、条件により異なるが、BTGaseが最も産生される時間まで培養すれば良く、通常2~4日程度である。

BTGaseは液体培養では培養液中に溶解されており、培養終了後培養液より固形分を除いた培養ろ液より採取される。

培養ろ液よりBTGaseを精製するには、通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。

例えば、エタノール、アセトン、イソプロピルアルコール等の有機溶媒による処理、硫酸、食塩

する。

BTGase活性は、特に記載しないかぎり以下に記載する方法により測定した。

#### 〈活性測定法〉

試薬A 0.2Mトリス塩酸緩衝液 (pH 6.0)

0.1Mヒドロキシルアミン

0.01 M還元型グルタチオン

0.03 Mベンジルオキシカルボニル・

L-グルタミニルグリシン

試薬B 3N-塩酸

12%-トリクロロ酢酸

5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1N-

HClに溶解)

上記溶液の1:1:1の混合液を試薬Dと

する。

酵素液の0.05mlに試薬A 0.5mlを加えて混合し37℃で10分間反応後、試薬Bを加えて反応停止と

等により塩析、透析、膜外ろ過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、吸着剤、等電点分離等の方法が使用出来る。又、これらの方法を適当に組合せる事によりBTGaseの精製度が上がる場合は適宜組合せて行う事が出来る。これらの方法によって得られる酵素は、安定化剤として各種の塩類、糖類、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え或いは加えることなく、膜外ろ過濃縮、逆浸透濃縮、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥の方法により液状又は固形のBTGaseを得ることが出来る。

BTGaseの活性測定はベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを基質として $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体を形成させ525nmの吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め活性を算出

Fe錯体の形成を行った後525nmの吸光度を測定する。対照としてあらかじめ熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵素液のかわりにL-グルタミン酸γ-モノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1μモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

#### BTGaseの酵素特性

上のようにして得られる精製BTGase、即ちストレプトベチシリウム・モバランスIFO 13819のトランスグルタミナーゼ(BTG-1と命名)、ストレプトベチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776のトランスグルタミナーゼ(BTG-2と命名)、ストレプトベチシリウム・シナモネウム・サブ・ユスビー・シナモ

ネウム I F O 12852のトランスグルタミナーゼ

(BTG-3と命名)についての酵素化学的性質は次の通り。

a) 至適 pH :

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、37℃、10分反応で、BTG-1の至適 pH は 6~7 にあり、BTG-2の至適 pH は 6~7 付近にあり、BTG-3の至適 pH は 6~7 付近にある。

b) 至適温度 :

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、pH 6、10分反応で、BTG-1の至適温度は55℃付近であり、BTG-2の至適温度は45℃付近であり、BTG-3の至適温度は45℃付近にある。

ルオキシカルボニルグルタミニルグリシンの場合の反応性は最も高い。この時の各種合成基質濃度は 5 mMとした。結果は表-1に示される。

なお、表-1中のCBZはベンジルオキシカルボニル基の略であり、Glnはグルタミン基の略であり、Glyはグリシル基の略であり、Aspはアスパラギン基の略である。

c) pH 安定性 :

37℃、10分間処理で、BTG-1は pH 5~9 で安定であり、BTG-2は pH 5~9 で安定であり、BTG-3は pH 6~9 で安定である。

d) 温度安定性 :

pH 7 で10分間処理では、BTG-1は40℃では88%活性が残存し、50℃では74%活性が残存し、BTG-2は40℃では86%活性が残存し、50℃では56%活性が残存し、BTG-3は40℃で80%活性が残存し、50℃では53%活性が残存する。

e) 基質特異性 :

各BTGaseを用い、各種合成基質とヒドロキシルアミンとの反応を調べた。いずれのBTGaseも合成基質がベンジルオキシカルボニルアスパラギニルグリシン、ベンジルオキシカルボニルグルタミン、グリシルグルタミニルグリシンの場合反応しない。しかし合成基質がベンジ

f) 金属イオンの影響 :

活性測定系に 1 mM濃度になるように各種金属イオンを加えて影響を調べた(結果は表-2に示される)。いずれのBTGaseもCu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>により活性が阻害される。

表-1

基 質	BTG-1	BTG-2	BTG-3
	%	%	%
CBZ-Gln-Gly	100	100	100
CBZ-Gln-Gly-oEt	63	44	42
CBZ-Gln-Gln-Gly	38	39	35
CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly	8	12	11
CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly	23	58	60
CBZ-Gln	0	0	0
CBZ-Asp-Gly	0	0	0
Gly-Gln-Gly	0	0	0

表-2

金属イオン	BIG-1	BIG-2	BIG-3
	%	%	%
None	100	100	100
CaCl <sub>2</sub>	101	102	102
BaCl <sub>2</sub>	101	99	105
CoCl <sub>2</sub>	103	103	103
CuCl <sub>2</sub>	79	82	86
FeCl <sub>3</sub>	96	104	106
KCl	96	99	105
MgCl <sub>2</sub>	102	104	103
MnCl <sub>2</sub>	98	97	97
NaCl	99	102	101
NiCl <sub>2</sub>	102	100	101
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	97	97	100
SrCl <sub>2</sub>	100	101	100
ZnCl <sub>2</sub>	15	24	24

## h) 等電点:

アンホライン等電点電気泳動により求めたところ、BIG-1の等電点 pI は 9 付近であり、BIG-2の等電点 pI は 9.7 付近であり、BIG-3の等電点 pI は 9.8 付近である。

## i) 分子量:

SDS ディスク電気泳動法より求めたところ、BIG-1の分子量は約 38,000 であり、BIG-2の分子量は約 41,000 であり、BIG-3の分子量は約 41,000 である。

## (4) BIGase の製造例

## a) BIG-1 の製造

ストレプトペルチシリウム・モバラエンス IF O 13819 を培地組成ポリペプトン 0.2%、グリコース 0.5%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1% からなる培地 (pH 7) 200 ml に接種し、30℃、48時間培養し、得られた培養液を

## g) 阻害剤の影響:

各阻害剤を 1 mM になるように加え、25℃、30 分放置後、活性を測定した (結果は表-3 に示される)。いずれの BIGase もパラクロロマーキュリー安息香酸 (PCMB と略する)、N-エチルマレイミド (NEM と略する)、モノコード酢酸により活性が阻害される。

表-3

阻害剤	BIG-1	BIG-2	BIG-3
	%	%	%
None	100	100	100
EDTA	102	98	99
PCMB	54	61	63
NEM	5	5	3
モノコード酢酸	64	50	67
PMSF	104	95	101

表-3 中 PMSF はフェニルメチルスルホニルフルオリドの略である。

ポリペプトン 2.0%、ラスターゲン 2.0%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1%、酵母エキス 0.2%、消泡剤としてアデカノール (商品名、旭硝化社製品) 0.05% からなる培地 20 ml (pH 7) に加え 30℃ で 3 日間培養後ろ過し、培養液 18.5 ml 得た。このものの活性は、0.35 u/ml である。

培養液を塩酸で pH 6.5 に調整し、予め 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化しておいた CG-50 (商品名、オルガノ社製品) のカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。さらに同緩衝液で不純蛋白質を洗い流した後、さらに 0.05~0.5 M の同緩衝液の濃度勾配をつくり、通液して溶出液を分画回収し、比活性の高い分画を集めた。電導度を 10 ms 以下になるように希釈後ブルーセファロースのカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。更に

0.05Mリン酸緩衝液(pH7)で不純蛋白質を洗い流した後、0~1Mの食塩濃度勾配をつくり通液して溶出液を回収し比活性の高い画分を集めた。UF6000膜を使い濃縮し、0.5Mの食塩を含む0.05Mリン酸緩衝液(pH7)で緩衝液を用いて平衡化させた。

得られた濃縮液を同緩衝液で予め平衡化しておいたセファデックスG-75(ファルマシアファインケミカル社製)を含むカラムに通し、同緩衝液を流して溶出液を分画した。この結果活性画分は単一のピークとして溶出された。このものの比活性は、培養液に対し625倍であり、回収率は47%であった。

#### b) BTG-2の製造

BTG-1の場合と同様にして、ストレプトペルチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776を30℃で3日間培養後ろ過し、培養液19mlを得た。

を水10mlに溶解した液を添加し、混練機にて十分に攪拌した。これを四角いステンレス製容器に入れ、50℃で1時間保持した後冷却し凝固した。このものを解凍後ミンチし、これを用いて下記配合のチキンハンバーグを作製した。このチキンハンバーグは、BTGase-1を添加していないチキンペーストを用いて作製したチキンハンバーグよりも肉粒感、ジューシー感にとみ、より本物の肉らしい食感を示した。官能評価結果(官能検査員10名)を下記表に示した。

#### <ハンバーグの配合>

BTGase-1含有チキンペースト	60.0g	塩 部
玉葱	20.0	
卵	6.9	
牛乳	6.9	
パン粉	5.0	
食塩	1.0	

このものの活性は0.28u/mlであった。

BTG-1の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素をえた。

#### c) BTG-3の製造

BTG-1の場合と同様にして、ストレプトペルチシリウム・シナモネウム・リブ・エスピー・シナモネウムIFO 12852を30℃で3日培養後ろ過し、培養液18.5mlを得た。このものの酵素活性は0.5u/mlであった。

BTG-1の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

以下に本発明の実施例について述べる。

#### 実施例1

鶏の付付き肉を摩砕したチキンペースト1kgに食塩5gを添加し混練機にて5分間高速で攪拌した。しかるのちにBTGase-11g(チキンペースト中の蛋白1gに対して約20Uに相当)

コショウ 0.1g

ナツメグ 0.1

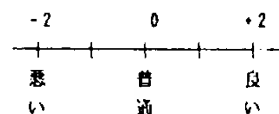
更に、BTGase-1含有チキンペーストの代りにBTGase-1を含有しないチキンペースト、鶏肉ミンチをそれぞれ用いて作製したチキンハンバーグの官能評価結果(官能検査員10名)を示した。

#### 官能評価結果

評価項目	BTGase-1含有チキンペースト	BTGase-1非含有チキンペースト	鶏肉ミンチ
1. 肉粒感の好ましき*	+1.0	-1.0	+1.5
2. ジューシー感の好ましき*	+1.0	0	+1.0
3. 食感全体の好ましき*	+1.0	-1.0	+1.5
4. 総合評価**	7	3	9



## ●評点尺度



## ●10点法

0        ~        5        ~        10

まずい    普通    通    おいしい

## 実施例2

チキンペーストに食塩を添加しなかったこと以外は実施例1と同じ条件で処理してBTGase-1を含有するチキンペーストの肉粒用素材を得た。解凍後ミンチして、これを用いてチキンシューマイを作製した。このチキンシューマイは、BTGase-1を含有しないチキンペーストを用いて作製したチキンシューマイよりも肉粒感、ジューシー感にとみ、より本物の肉らしい食感を示した。

## 〔発明の効果〕

本発明の冷凍肉粒用素材は安価で且つ良好な肉粒感を賦与することができるので、ハンバーグ、シューマイ、ギョーザ、メンチカツなどの畜肉製製品に多量に用いることができる。

出願人(特)味の素株式会社  
 代理人 味・素冷凍食品株式会社  
 代理人 弁護士 川口 義雄  
 代理人 弁護士 中村 至  
 代理人 弁護士 船山 武夫  
 代理人 弁護士 霜越 正夫